

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 187–189

Enzymkinetische Glucosebestimmung nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode

Enzymkinetische Substratbestimmung unter Verwendung kompetitiver Inhibitoren, II. Mitteilung

Von R. Müller-Matthesius

Aus der Anwendungstechnik der Fa. EppendorfGerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg

(Eingegangen am 20. November 1973/17. März 1975)

Die Empfindlichkeit enzymkinetischer Substratbestimmungen kann mit Hilfe kompetitiver Inhibitoren verbessert werden. Als Beispiel wird hier eine Glucosebestimmung mit Glucosedehydrogenase in Gegenwart von Kaliumthiocyanat beschrieben. Vorteil der Methode ist die schnelle Durchführbarkeit bei ausreichend guter Präzision.

Enzyme kinetic glucose determination by the glucose dehydrogenase method. Enzyme kinetic substrate determination using competitive inhibitors, II.

The sensitivity of enzyme kinetic substrate determinations can be improved with the aid of competitive inhibitors. As an example, the determination of glucose dehydrogenase in the presence of potassium thiocyanate is described. The method has the advantage of rapid operation with satisfactory precision.

In der ersten Mitteilung (1) haben wir gezeigt, daß die häufig unzureichende Empfindlichkeit enzymkinetischer Substratbestimmungen mit Hilfe kompetitiver Inhibitoren verbessert werden kann. Der Effekt beruht auf einer Erhöhung der *Michaelis*-Konstante. In einem zweiten Beispiel soll nun eine einfache und schnelle auf der Glucose-Dehydrogenase¹)-Reaktion (2) basierende Glucosebestimmung vorgestellt werden.

Experimentelles

Geräte

Eppendorf Enzymmeßplatz 5086 (kinetische Bestimmungen), Eppendorf Substratmeßplatz 5091 (Endwertbestimmungen), Eppendorf Pipetten bzw. Probe-Reagenz-Dosierer (Mikroliterbereich), geeichte Vollpipetten (Milliliterbereich).

Labor-pH-Meter der Fa. Knick. – Tischrechner Combitron S der Fa. Diehl mit Sonderprogramm (Archiv-Nr. 10344) für lineare Regression, Korrelationskoeffizient und Streuung um die Regressionsgerade.

Reagenzien

1. Kaliumthiocyanat (Merck, Nr. 5125).
2. Dinatriumsalz der Äthylendinitrilotetraessigsäure (Titriplex III) (Merck, Nr. 8418).
3. D-(+)-Glucose (Fluka, wasserfrei, puriss.).
4. Preciset Glucose (Boehringer Mannheim, Nr. 15726 TQAI).
5. Nicotinamid-adenin-dinucleotid, freie Säure (Merck, Nr. 3406).

6. 120 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,6, und lyophilisierte Glucose-Dehydrogenase aus Merckotest Probepackung „Blutzucker, GlucDH-Methode“.
7. Testcombination „Glucose, HK-Methode“ (Boehringer Mannheim, Nr. 15931).

Arbeitsweise

Glucose-Dehydrogenase-Aktivität

Die für alle folgenden Versuche verwendete Glucose-Dehydrogenase-Suspension in 120 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,6 wurde zur Aktivitätsbestimmung 1 + 10 mit Puffer verdünnt, sowie eine Lösung mit 280 mmol/l Glucose in gleichem Puffer angesetzt.

20 µl der verdünnten Enzymlösung wurden mit 500 µl Glucose-Lösung auf 25 °C inkubiert und die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme nach Start mit 20 µl 150 mmol/l NAD⁺ bei Hg 366 nm verfolgt.

Berechnung und Ergebnis (ϵ = Molextinktion NADH, d = Schichtdicke, EV = Endvolumen, PV = Probenvolumen, F = Verdünnungsfaktor):

$$U/ml = \frac{\Delta E}{\min} \cdot \frac{10^3}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{EV}{PV} \cdot F$$

$$= 0,205 \frac{10^3}{3,3 \cdot 10^3 \cdot 1,00} \cdot \frac{540}{20} \cdot 11 = 18,5$$

Hemmtyp Kaliumthiocyanat

Je 100 µl wäßrige Glucose-Lösung mit 27,8–33,3–33,8–44,4–50,0–55,5 mmol/l wurden in 1-cm-Küvetten mit je 500 µl folgender frisch angesetzter Lösungen auf 25 °C inkubiert:

- a) Enzym-Suspension, 1 + 40 mit Puffer verdünnt,
- b) zusätzlich 410 mmol/l Kaliumthiocyanat,
- c) 620 anstelle von 410 mmol/l Kaliumthiocyanat.

Durch Zumischen von 20 µl 200 mmol/l NAD⁺ wurde die Reaktion gestartet, 10 Sekunden danach registriert: Papiervorschub 5 cm/min, Spreizung 20 cm für E = 0–1, Meßwellenlänge Hg 366 nm.

¹) β -D-Glucose: NAD (P) Oxidoreductase, E.C. 1.1.1.47

Der reziproke Tangens des Winkels α mit der Zeitachse, der aus dem geradlinigen Anfangsbereich der Schreiberaufzeichnung erhalten wurde, wurde gegen die reziproke millimolare Glucosekonzentration im Test aufgetragen (*Lineweaver-Burk-Diagramm*).

Messung der Glucosekonzentration

Allgemein wurden 20 μ l Probe mit 500 μ l einer Lösung von 825 mmol/l Kaliumthiocyanat und 55 mmol/l EDTA in Enzym-Suspension in der 1-cm-Küvette auf 25 °C inkubiert und die Reaktion durch Zumischen von 20 μ l 200 mmol/l NAD⁺ gestartet.

20 Sekunden danach wurde der Papiervorschub des Schreibers eingeschaltet: Spreizung 20 cm für E = 0–1, Meßwellenlänge Hg 366 nm. Aus der über etwa 30 Sekunden praktisch linearen Registrierung wurde der Winkel α mit der Zeitachse ermittelt.

Zur Aufnahme der *Eichkurve* wurden als Probe wäßrige Glucose-Lösungen mit 27,8–33,3–38,8–44,4–50,0 und 55,5 mmol/l eingesetzt und die mit Papiervorschub 10 cm/min (folgende Versuche: 5 cm/min) gemessenen Tangens α gegen diese Konzentrationen aufgetragen.

Im Falle der *Wiederfindungsversuche* wurde als Probe Qualtrol mit Zusatz von 5,24–8,98–12,6–15,7–31,4 mmol/l Glucose verwendet. Berechnet wurde gegen einen wäßrigen Glucose-Standard (Preciset) mit 5,55 mmol/l nach der Formel:

$$c_{\text{Probe}} = \tan \alpha_{\text{Probe}} \cdot \frac{5,55}{\tan \alpha_{\text{Standard}}}$$

Vom Ergebnis wurde der gleichartig ermittelte Glucose-Leerwert des Qualtrols abgezogen.

Die analysierten *Humanplasmen* wurden durch Zentrifugieren von Fluorid-EDTA-Benzoesäure-stabilisiertem Venenblut gewonnen und parallel nach der Hexokinase²⁾-Endwertmethode mit Enteiweißung (Eppendorf-Vorschrift AV 707-T) gemessen. Bei beiden Verfahren wurde gegen den gleichen Glucose-Standard berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Unter zahlreichen untersuchten Hemmstoffen eignete sich Kaliumthiocyanat, das im *Lineweaver-Burk-Diagramm* das Bild einer kompetitiven Hemmung ergab (3), am besten für den vorgesehenen Zweck, wenn auch ein Gemisch aus Glucose-Dehydrogenase und KSCN nur dann über mehrere Stunden verwendet werden konnte, wenn EDTA als Stabilisator zugesetzt wurde. Kaliumthiocyanat zeichnet sich jedoch durch ausgesprochen gute Löslichkeit aus, ändert den pH-Wert nicht und besitzt im vorgesehenen Meßwellenbereich keine Eigenextinktion.

Wie bei früheren Untersuchungen (1) wurde wiederum ein Winkelauswertverfahren bevorzugt, das gegenüber üblichen fixed-time-Zweipunktmessungen (4) Meßschwankungen leichter erkennen und ggf. mitteln läßt.

Durch Wahl einer geeigneten Inhibitor- und Enzymkonzentration sowie eines geeigneten Probenanteils im Test ergab sich im $\tan \alpha$ -Probenkonzentrations-Diagramm Linearität bis 50 mmol/l.

Unter den Meßbedingungen (Papierverschub 10 cm/min, Hg 366 nm) lag der Winkel an den für Blutglucose

gültigen Normalwertgrenzen (etwa 5 mmol/l) jedoch nur bei 10°. Um noch auf 0,05 mmol/l differenzieren zu können (Ablesegenauigkeit etwa 0,2°), wurde für die folgenden Konzentrationsmessungen die Papiervorschubgeschwindigkeit halbiert und dafür in Kauf genommen, daß aus gerätetechnischen Gründen Glucosekonzentrationen größer etwa 25 mmol/l nicht mehr sicher abgelesen werden konnten. Damit wurde ein günstiger Kompromiß zwischen Empfindlichkeit und Konzentrationsmeßbereich gefunden.

Wie die folgenden Ergebnisse zeigen, eignet sich das Verfahren für den Einsatz von Serum oder Plasma ohne Enteiweißung. Im Kontakt mit Blutzellen wird die Reaktion jedoch gehemmt, so daß Vollblut nicht direkt einsetzbar ist.

Die Wiederfindungsrate darf als gut bezeichnet werden (Tab. 1). Dagegen lagen bei Kontrollseren (Tab. 2), deren Sollwert nach der Hexokinase-Endwertmethode mit Enteiweißung ermittelt wurde, die kinetisch gefundenen Glucosekonzentrationen meist an der oberen Grenze des Vertrauensbereich, obwohl wegen des Volumenverdrängungseffektes zu tiefe Werte erwartet worden waren (5). Größtenteils dürfte dieser Effekt jedoch durch den von der Fa. Boehringer Mannheim angegebenen Berechnungsfaktor kompensiert werden, der gegenüber dem „theoretischen“ Faktor um fast 3% tiefer angesetzt ist. Das mit Hyland Control Serum erhaltene Ergebnis läßt sich mit tiefen Sollwerten erklären, wie sie für die Glucose-Oxidase³⁾-Methode typisch sind (6).

Tab. 1. Wiederfindungsraten bei Einwaage von Glucose in Qualtrol. Konzentrationsangaben in mmol/l Glucose.

zugewogene Konzentration	gefunden	nach Abzug des Eigengehaltes	Recovery
31,4	37,7	31,8	101,5%
15,7	22,0	15,9	101,0%
12,5	18,5	12,6	100,5%
8,99	15,1	9,21	102,0%*
5,24	11,2	5,27	100,5%

Tab. 2. Analyse von Kontrollseren. Konzentrationsangaben und Standardabweichungen in mmol/l Glucose.

Serum	deklariert		gefunden			VK
	\bar{x}	$\bar{x} \pm 2s$	n	\bar{x}	s	
Hyland Control						
Serum II	11,4 ¹⁾	10,5–12,2	12	12,44	0,25	2,0
Monitrol II	11,6 ²⁾	10,7–12,5	12	11,89	0,32	2,7
Precinorm S	5,95	5,35–6,55	12	5,86	0,13	2,2
Pathotrol	13,9 ²⁾	13,2–14,6	12	14,67	0,29	2,0
Labtrol	5,15 ²⁾	4,80–5,50	12	5,37	0,16	3,0

¹⁾ Glucose-Oxidase (Hyland)

²⁾ Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Endwertmethode mit Enteiweißung (Boehringer)

³⁾ β -D-Glucose: Oxygen Oxidoreductase, E.C. 1.1.3.4

²⁾ D-Hexose 6-phosphotransferase, E.C. 2.7.1.1

Wie Vergleichsmessungen an 60 Humanplasmen (Konzentrationsbereich etwa 4 bis 16 mmol/l Plasma) nach der Hexokinase-Endwertmethode mit Enteiweißung ergaben, besteht zwischen beiden Verfahren mit dem Korrelationskoeffizienten $r = +0,9965$ (signifikant von Null verschieden) eine enge Korrelation (Abb. 1), jedoch zeigt die Regressionsgerade $y = 0,1255 + 0,9272 x$ durchschnittlich 7% tiefere Werte für das kinetische Verfahren an. Da jeweils auf den gleichen Standard bezogen wurde, dürfte sich der Volumenverdrängungseffekt hier voll auswirken, so daß die Ergebnisse mit der Theorie (5) in Einklang stehen. Die an Kontrollseren gemessene Präzision in der Serie (Tab. 2) ist nach unseren Erfahrungen akzeptabel und mit der ebenfalls manuell durchgeführten Hexokinase-Endwertmethode vergleichbar.

Die Präzision von Tag zu Tag wurde an Precinorm S mit VK = 3,4% ermittelt.

Insgesamt bietet das kinetische Verfahren, besonders wegen der schnellen Durchführbarkeit, Vorteile gegenüber konventionellen Endwertbestimmungen. Von besonderer Bedeutung aber ist, daß die Meinung von Fachleuten (7), enzymkinetische Substratbestimmungen seien in Gegenwart unbekannter Effektoren nicht durchführbar, keine Bestätigung fand. In der Zukunft könnte dies ein weiteres wichtiges Argument für den „künstlichen“ Einsatz von Inhibitoren werden.

Abschließend muß betont werden, daß die hier publizierten Ergebnisse nur mit einer frischen Charge Glucose-Dehydrogenase erhalten wurden. Bei Alterung des Enzyms treten offenbar irreversible Änderungen ein, die

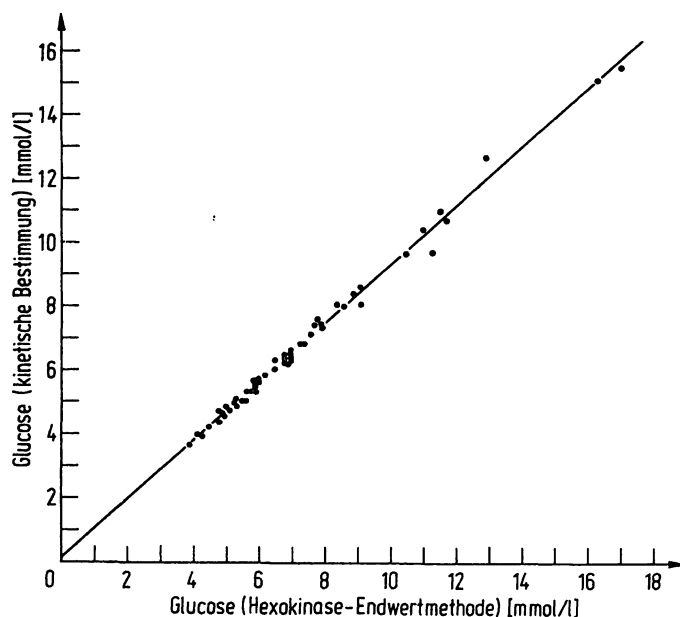


Abb. 1. Korrelation der Glucosebestimmung nach der direkten kinetischen Bestimmung und der indirekten Hexokinase-Endwertmethode.

zu einer Lag Phase führen, so daß das Verfahren dann nicht mehr anwendbar ist.

Danksagung

Der Fa. Merck, Darmstadt, danken wir für die Überlassung von Probepackungen, Herrn Dr. K. Bonitz, Chefarzt am Allgemeinen Krankenhaus Eilbeck, Hamburg, für das Bereitstellen von Blutproben. Frau S. Benner und Herr R. Zeitner führten Analysen und Berechnungen gewissenhaft durch.

Literatur

1. Müller-Matthesius, R. (1975), diese Z., 13, 169–170.
2. Banauch, D., Helger, R. & Lang, H. (1973), Vortrag, Jahrestagung der Dtsch. Ges. f. Klin. Chemie, Hannover; Barman, Th. E. (1969), Enzyme Handbook, S. 70, Springer, Berlin.
3. Ahlers, J., Arnold, A., von Döhren, Fr. R. & Peter, H. W. (1974), Enzymkinetik, S. 63ff., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
4. Tiffany, T. O., Burtis, C. A., Mailen, J. C. & Thacker, L. H. (1973), Anal. Chem. 45, 1716–1723.
5. Bürgi, W., Richterich, R. & Mittelholzer, M. L. (1967), Klin. Wochenschr. 45, 83–86.
6. Richterich, R. (1971), Klinische Chemie, 3. Aufl., S. 269, S. Karger, Basel.
7. Devlin, Th. M. (1959), Anal. Chem. 31, 977–981.

Dr. R. Müller-Matthesius
Behringwerke AG
Abt. Reagenzien/Forschung
3550 Marburg/Lahn
Postfach 1130

